ภาคผนวก ก.

อาหารและการเตรียมอาหารที่ใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรีย

1. Starch Agar (Bailey and Scott, 1966)

Nutrient agar	1000	มล.
Starch (soluble)	2.0	กรัม

เมื่อชั่ง nutrient agar สำเร็จรูปมาแล้ว เติมแป้ง 2 กรัมลงไป แล้วจึงเติมน้ำกลั่น นำไปต้มจนกระทั่งแป้งละลาย สังเกตเห็นอาหารมีลักษณะใสจึงนำไปปรับ pH เป็น 6.8-7.0 แล้วนำไปใส่ขวด หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Tryptone Broth or 1 % Tryptone (Bailey and Scott, 1966)

Tryptone or Trypticase	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ผสม tryptone กับน้ำกลั่นให้เข้ากันดี ถ่ายใส่หลอด ๆ ละ 10 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Motility Test Medium (Bailey and Scott, 1966)

Beef extract	3.0	กรัม
Celysate peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

pH 7.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก. ละลายส่วนผสมดังกล่าวให้เข้ากัน เติม triphenyl tetrazolium 0.05 กรัม นำไปตั้งไฟนานประมาณ 1 นาที คนให้ส่วนผสมละลายจนหมด

ข. เทใส่หลอดทดลองฝาเกลียว นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ค. เมื่อทิ้งให้เย็น หมุนฝาคลายเกลียวให้หลวม เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. Gelatin Agar (Blazevic and Ederer, 1975)

Gelatin	4.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH 6.8 แล้วนำไปให้ความร้อนจนเดือดประมาณ 1 นาที จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Falkow's Decarboxylase Broth Base (Edward and Ewing, 1972)

5.1 อาหารพื้นฐาน (Basal Medium)

Peptone	5.1	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Bromocresol purple	10	มล.
น้ำกลั่น	900	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH 6.7-6.8 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.2 สารละลายกรดอมิโน

Arginine	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH 6.7-6.8 จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

5.3 เติมสารละลายกรดอมิโน ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ 100 มล. ลงในอาหารพื้นฐาน 900 มล. ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 °ซ ใส่หลอดทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ที่ปราศจากเชื้อ 5.0 มล.

6. Nutrient Agar (Rohde, 1967)

Nutrient broth	1000	มล.
Agar	15	กรัม

ละลาย agar ใน nutrient broth นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. Nutrient Broth (Rohde, 1967)

Beef extract	10.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.
pH	7.2	

ละลาย peptone และ beef extract โดยใช้ความร้อนช่วย จากนั้นเติม sodium chloride ลงไปแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Salt Broth 2 % (Bailey and Scott, 1966)

Nutrient broth	1000	มล.
Sodium chloride	20	กรัม
pH	7.2	

ละลายส่วนผสมที่อยู่ข้างบนให้เข้ากัน แล้วเทใส่หลอดทดสอบขนาด 6 x $\frac{1}{2}$ นิ้ว หลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 °ซ นาน 20 นาที

เช่นเดียวกันเตรียม salt broth 4 %, salt broth 6 % ก็ใช้ sodium chloride ผสมกับ nutrient broth 40 และ 60 กรัม ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. Oxidation Fermentation Test Medium (A.C. Baird-Parker ; 1970)

Difco tryptone	1.0	กรัม
Difco yeast extract	0.1	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Bromocresol purple	0.004	กรัม
Difco agar	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.
pH	7.2	

ต้มส่วนผสมข้างบนเพื่อละลายวุ้น แล้วเทใส่หลอดทดลองขนาด 6 x $\frac{1}{2}$ นิ้ว หลอดละ 10 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 °ซ เป็นเวลา 20 นาที นำออกมาให้อาหารแข็งตัวในลักษณะที่เป็น agar tall อาหารจะมีลักษณะเป็น semisolid ถ้ายังไม่ใช้ทันที หลังเก็บไว้แล้วเมื่อจะนำมาใช้ต้องต้มให้หลอมเหลวแล้วให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่หลอดอาหารในอ่างน้ำแข็ง เตรียมอาหารนี้เป็นชุด ๆ ละ 2 หลอดหนึ่งไม่ปิดผิวหน้าเป็น aerobic tube อีกหลอดปิดผิวหน้าของอาหารโดยเติม sterile liquid paraffin ลงในหลอดสูงประมาณ 1-2 นิ้ว เป็น anaerobic tube

10. Acid Production from Sugar (Bailey and Scott, 1966)

$NH_4H_2PO_4$	0.1	กรัม
Potassium chloride	0.02	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02	กรัม
Difco yeast extract	0.1	กรัม
Bromocresol purple	0.004	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Agar	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	95	มล.

ละลายส่วนผสมข้างบนให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันอัดไอที่ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เมื่อจะใช้เตรียมสารละลายน้ำตาล sterile fitered solution ของน้ำตาล glucose, lactose, mannitol sucrose, arabinose และ maltose ให้เป็น 10 % (W/V) แล้วเติมสารละลายน้ำตาลเหล่านี้ลงในอาหารที่เตรียมไว้ 5 มล. ผสมให้เข้ากันดี เทใส่จานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

11. Antibiotic Assay Medium (Pelczar, 1977)

Beef extract	1.5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	6	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ละลายส่วนผสมข้างบนให้เข้ากันโดยนำไปต้มให้เดือดนาน 1 นาที แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที (อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้อาจจะมีส่วนผสมของ dextrose ด้วยก็ได้ ถ้ามี dextrose จะใส่ลงไป 1 กรัม)

12. Blood Agar (Cowan and Steel, 1970)

Defibrinated blood	50	มล.
Nutrient agar	950	มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละลาย nutrient agar แล้วนำไปต้มให้เดือดนาน 1 นาที แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เมื่อจะใช้นำ blood เทผสมกับ nutrient agar ผสมให้เข้ากันดี แล้วเทใส่ plate ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

13. Trypticase Soy Broth (Ericsson and Sherris, 1971)

Trypticase peptone	15	กรัม
Phytone peptone (Soya peptone)	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันโดยนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ คนตลอดเวลา จนกระทั่งเข้ากันดีแล้วปรับ pH ให้ได้ 7.3 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

14. Aeromonas hydrophila Medium (Kaper et.al., 1979)

Proteose peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Tryptone	10	กรัม
L-ornithine HCl	5	กรัม
Mannitol	1	กรัม
Inositol	10	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Sodium thiosulfate	0.2	กรัม
Ferric Ammonium citrate	0.5	กรัม
Bromocresol purpul	0.02	กรัม
Agar	3	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.
pH	6.7	

ละลายส่วนผสมข้างบนให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน แล้วเทใส่หลอดขนาด 6 x $\frac{1}{2}$ นิ้ว หลอดละ 10 มล. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 12 นาที โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นำออกมาให้อาหารแข็งตัวในลักษณะที่เป็น agar tall อาหารมีลักษณะเป็น semisolid

15. MR-VP Broth (Rohde, 1967)

Peptone	7.0	กรัม
Dextrose	5.0	กรัม
Potassium phosphate	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH 6.8 เทใส่หลอดทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มม. หลอดละ 0.5 มล. หรือ 5.0 มล. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข.

สีย้อม น้ำยาทดสอบและวิธีเตรียม

สีย้อม

1. Crystal violet stain (Stewart, 1974)

ส่วนประกอบ	crystal violet	0.5	กรัม
	น้ำกลั่น	100	มล.
วิธีเตรียม	ละลาย crystal violet	0.5	กรัม ในน้ำ 100 มล. เขย่าให้เข้ากัน

2. Safranin solution (Stewart, 1974)

ส่วนประกอบ	Safranin	2.5	กรัม
	Ethyl alcohol 95 %	100	มล.
	น้ำกลั่น	100	มล.
วิธีเตรียม	ละลาย safranin ใน alcohol เขย่าให้เข้ากัน แล้วผสมลงในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้		

3. Gram's iodine solution (Stewart, 1974)

ส่วนประกอบ	Iodine	1.0	กรัม
	Potassium iodine	2.0	กรัม
	น้ำกลั่น	300	มล.
วิธีเตรียม	ละลาย iodine 1 กรัม และ potassium iodine 2 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มล. ปล่อยทิ้งไว้ 6-8 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำที่เหลือให้ครบ 300 มล. เขย่าให้เข้ากัน		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. Decolourizer (Bailey and Scott, 1966)

ส่วนประกอบ Ethanol 95 % 250 มล.

Acetone 250 มล.

วิธีเตรียม ผสม acetone กับ ethanol ให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวด glass-stoppered

5. Leifson's flagella stain

ส่วนประกอบ Solution A : Basic fuchsin 1.2 กรัม

Ethanol 95 % 100 มล.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันโดยพยายามเขย่าบ่อย ๆ จากนั้นเก็บสารละลายที่ได้ในขวดที่ปิดฝาแน่นเพื่อป้องกันการระเหย

Solution B : Tannic acid 3.0 กรัม

น้ำกลั่น 100 มล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน และถ้าต้องการเก็บสารละลายนี้ไว้เป็นเวลานานให้เติม phenol 0.2 % ลงไปด้วยเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อรา

Solution C : Sodium chloride 1.5 กรัม

น้ำกลั่น 100 มล.

โดยปกติสารละลาย A, B และ C จะคงที่ได้นานที่อุณหภูมิห้อง ในการเตรียม working solution ให้ผสมสารละลาย A, B และ C ในปริมาณที่เท่า ๆ กัน จากนั้นให้เก็บสารละลายผสมไว้ในขวดที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปิดสนิท และเก็บไว้ในตู้เย็น หรือตู้แช่ ถ้าเก็บสารละลายผสมไว้ในตู้แช่ก่อนนำมาใช้ให้เขย่าขวดก่อนใช้ด้วย เนื่องจากแอลกอฮอล์จะแยกอยู่ชั้นบน

(คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2523)

น้ำยาทดสอบ

1. Barritt's Reagent (Branson, 1972)

α - Naphthol	5.0	กรัม
Ethanol 95 %	100	มล.
Potassium hydroxide	40.0	กรัม

1.1 ใส่สาร α -Naphthol 5.0 กรัม ใน Ethanol 100 มล.

1.2 ใส่สาร Potassium hydroxide ในน้ำกลั่น

1.3 ผสมสารตามข้อ 1.1 และ 1.2 ในอัตราส่วน 2:1, 2:2 และ 6:2

2. Oxidase Reagent (Blazevic and Ederer, 1975)

สารละลายที่ 1 α -Naphthol 1 กรัม ละลายใน 100 มล. ของ Ethanol 95 %

สารละลายที่ 2 p-aminodimethylaniline HCl (หรือ Oxalate) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. สารละลายที่ 2 ควรเก็บไว้ในตู้เย็น

ผสมสารละลายที่ 1 และสารละลายที่ 2 ในอัตราส่วนเท่า ๆ กัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. Kovacs' Reagent (Bradshaw, 1963)

Para-dimethylaminobenzaldehyde	5.0	กรัม
Amyl or Buthyl alcohol	75	มล.
Hydrochloric acid 37 %	25	มล.

ใส่ Para-dimethylaminobenzaldehyde 5.0 กรัม ลงในแอลกอฮอล์ 75.0 มล.

เติมกรดเกลือ 37 % เขย่าให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

4. Methyl Red Solution (Steward, 1974)

Methyl red	0.1	กรัม
Ethanol 95 %	300	มล.
น้ำกลั่น	200	มล.

ละลาย Methyl red ในแอลกอฮอล์ 200 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรทั้งหมด 500 มล.

5. Developer Solution (Branson, 1972)

Mercuric chloride	15.0	กรัม
Hydrochloric acid	20	มล.
น้ำกลั่น	100	มล.

5.1 ใส่ Hydrochloric acid ลงในน้ำกลั่น 50 มล. เขย่าให้เข้ากัน

5.2 ใส่ Mercuric chloride ลงในสารผสมข้อ 5.1 เขย่าให้เข้ากัน

5.3 เติมน้ำ 50 มล. ลงในสารผสมตามข้อ 5.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. Iodine Solution (Cowan and Steel, 1970)

Iodine	5.0	กรัม
Potassium iodide (KI)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

ละลาย KI และ iodine ในน้ำ 10 มล. แล้วเติมน้ำเข้าไปให้ครบ 100 มล.

7. Hydrogen peroxide (Cowan and Steel, 1970)

H_2O_2 3 %

เก็บไว้ในที่ไม่มีแสงสว่างและใส่ไว้ในตู้เย็น ในขวดพลาสติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค.

หลักการ วิธีการ และผลการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี

1. การตรวจการติดสีกรัม (Gram stain) มีวิธีการดังนี้คือ

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบ ซึ่งเพาะไว้อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง มาผสมกับน้ำ 1-2 หยด บนสไลด์สะอาด ละเลงเชื้อให้กระจายให้ทั่ว ๆ เมื่อเชื้อแห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ นำสไลด์มาวางบนที่ย้อม หยดน้ำยา crystal violet ทิ้งไว้นาน 30-60 วินาที เทสีออก ล้างด้วยน้ำยาไอโอดีน นาน 1-2 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกอกที่ไหลช้า ๆ เทน้ำยา decolourizer ให้ไหลผ่านสไลด์นาน 20-60 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกอกอย่างรวดเร็ว ต่อไปเทสี safranin ซึ่งใช้เป็นสีย้อมควบคู่นาน 30-60 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกอก ซับน้ำออกปล่อยให้แห้งในอากาศ นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้หัวน้ำมัน ถ้าเชื้อที่นำมาทดสอบเป็นกรัมบวกจะติดสีม่วงน้ำเงินเช่นเดียวกัน ถ้าเป็นกรัมลบจะติดสีแดง

2. การตรวจหาแฟลเจลลา มีวิธีการดังนี้คือ

ใช้เชื้อที่มีอายุ 9 ชั่วโมง เนื่องจากแฟลเจลลายังไม่หลุดจากเซลล์ และก่อนตรวจหาแฟลเจลลานี้จะตรวจการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยวิธี Hanging drop และ motility test ก่อน การตรวจหาแฟลเจลลามีวิธีการคือ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบในหลอดอาหารเอียง (slant tube medium) ให้ได้เชื้ออายุ 9 ชั่วโมง นำน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมในหลอดที่เพาะเชื้อนาน 9 ชั่วโมงนี้ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยให้เชื้อหลุดจากอาหารวุ้นผสมอยู่ในน้ำกลั่น ใช้ปิเปต 1 มล. หรือปาสเจอร์ปิเปตดูดน้ำกลั่นที่บริเวณผิวหน้าขึ้นมาแล้วหยดบนสไลด์ที่เอียงทำมุมประมาณ 30° กับแนวราบ ให้น้ำนี้ค่อย ๆ ไหลไปที่ปลายสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อากาศ นำสไลด์มาวางบนที่ย้อมสี หยดน้ำยา Leifson's flagella stain ลงให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ทิ้งไว้นาน 20-30 นาที เทน้ำยาทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลอกที่ไหลเบา ๆ ทิ้งให้แห้งในอากาศแล้วนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้หัวน้ำมัน ถ้ามีแฟลเจลลาจะเห็นแฟลเจลลาติดสีแดงเป็นเส้นอยู่ตามตำแหน่งต่าง ๆ ของเซลล์

3. การตรวจรูปร่าง ขนาด และการจัดระเบียบของเซลล์

ตรวจพร้อมกับการตรวจการติดสีกรัม สำหรับการวัดหาขนาดของเซลล์นั้นใช้ stage micrometer และ ocular micrometer ช่วยในการวัดโดยใส่ oculur micrometer ลงในช่อง eye piece ของกล้องจุลทรรศน์แล้วนำ stage micrometer วางบนแท่นสไลด์ตรวจหาขนาดของ ocular micrometer ที่กำลังขยายต่าง ๆ ว่า 1 ช่อง ocular micrometer นี้มีขนาดเท่ากับเท่าใด ในที่นี้คำนวณได้ว่า 1 ช่อง ocular micrometer = 0.001 มม. ที่กำลังขยาย 100 เท่า

4. ทดสอบการย่อยสลายแป้ง (Starch Hydrolysis Test)

ทดสอบโดยใช้สารละลายไอโอดีน

วิธีการ

1. เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยวิธีลากเป็นเส้นตรงยาวประมาณ 2 ซม. ลงตรงกลางอาหารในจานเพาะเชื้อ ซึ่งอาหารก็คือ starch agar นำจานอาหารดังกล่าวไปทำให้แบคทีเรียเจริญในตู้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48 ชั่วโมง

2. ราดสารละลายไอโอดีนจนท่วมโคโลนีอ่านผลการทดสอบหลังจากราดสารละลายไอโอดีน 30-60 วินาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดสอบ

ปฏิกิริยาที่เป็นบวกจะเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี ส่วนบริเวณอื่นจะปรากฏสีน้ำเงิน ปฏิกิริยาที่เป็นลบรอบโคโลนีจะเป็นสีน้ำเงินและไม่มีบริเวณใส เนื่องจากการรวมตัวของแป้งที่ไม่ถูกย่อยกับไอโอดีน (Blazevic and Ederer, 1975)

5. ทดสอบการย่อยสลายเจลาติน (Gelatin Hydrolysis Test)

ทดสอบโดยใช้ Frazier's Method Modified

วิธีการ

1. เพาะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบโดยการลากเป็นเส้นตรงยาวประมาณ 2 ซม. บน gelatin medium ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำจานอาหารไปทำให้แบคทีเรียเจริญที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2. เท Developer solution ใส่จานเลี้ยงเชื้อจนท่วมบริเวณที่เชื้อเจริญ

ผลการทดสอบ

ปฏิกิริยาที่เป็นบวกจะเกิดบริเวณใสรอบ ๆ บริเวณเชื้อเจริญปฏิกิริยาที่เป็นลบจะไม่เกิดบริเวณใสรอบ ๆ บริเวณที่เชื้อเจริญ เนื่องจากแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินจะเกิดเป็นตะกอนขาวขุ่นเพราะในสารละลาย Developer มี mercuric chloride ทำปฏิกิริยากับเจลาตินได้สารสีขาวขุ่นและตกตะกอน (Blazevic and Ederer, 1975)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. <u>ทดสอบการเกิดสารอินโดล</u> (Indole Test)

อินโดลเป็นสารที่ได้จากการสลายตัวของกรดอะมิโนชนิด tryptophane โดยอาศัยเอนไซม์ tryptophanase ได้ผลิตผลสุดท้ายเป็น indole pyruvic acid และแอมโมเนีย tryptophane ที่สลายนี้มาจาก peptone หรือ tryptone หรือ tryptophase (Blazevic and Ederer, 1975) การทดสอบการเกิดสารอินโดลสามารถทดสอบได้โดยใช้วิธีของ Kovacs (Kovacs' Method)

<u>วิธีการ</u>

1. เพราะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหาร tryptone broth ที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบขนาด 16 มม. นำหลอดทดสอบไปทำให้แบคทีเรียเจริญในตู้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง

2. หยด Kovacs' reagent ลงไป 0.5 มล.

<u>ผลการทดสอบ</u>

ปฏิกิริยาที่เป็นบวกจะเกิดวงแหวนสีแดงที่ผิวหน้าของอาหาร ปฏิกิริยาที่เป็นลบวงแหวนที่ผิวหน้าของอาหารจะไม่เป็นสีแดง

7. <u>Motility Test</u>

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการเคลื่อนที่ใน motility test medium โดยการเพาะเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบแทงลงในอาหารตรง ๆ (stab) เพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 36 °ซ อ่านผลหลังการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพาะเชื้อนาน 1-2 วัน แบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้จะเจริญออกรอบ ๆ แนวที่เพาะเชื้อออกทุกทิศทางพวกที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จะเจริญเฉพาะบริเวณแนวที่แทงลงเท่านั้น

8. Acid Production from Sugar

ในที่นี้ใช้น้ำตาล glucose, lactose, manitol, sucrose, arabinose และ maltose

วิธีการ

เพาะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงในอาหารที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยลากเป็นเส้นเดี่ยว ๆ ในอาหารเพาะเชื้อไว้ที่ 37 °ซ ตรวจสอบการเกิดกรดทุกวันจนครบ 7 วัน

ผลการทดสอบ

โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงสีของ indicator จากสีม่วงเป็นสีเหลือง เนื่องจากมีการสร้างกรดออกมา

9. การตรวจหาเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase Test)

เอนไซม์ oxidase เป็น cytochrome complex ที่ประกอบด้วย cytochrome a และ a_3 พบโดยทั่ว ๆ ไปในแบคทีเรียที่หายใจโดยใช้ออกซิเจน รวมทั้งพวก Enterobacteriaceae ในแบคทีเรียสารที่เป็นตัวรีดิวส์ เอนไซม์ oxidase คือ cytochrome C ดังนั้นในการตรวจสอบเอนไซม์ออกซิเดสเท่ากับเป็นการตรวจสอบหา cytochrome C ได้ด้วย (Blazevic and Ederer,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1975) การตรวจสอบหาเอนไซม์ออกซิเดสใช้วิธีของ Kovacs (Kovacs' Method)

วิธีการ

ใช้ลวดแตะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเล็กน้อย นำมาแตะบนกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วย 0.5-1 % Tetramethyl-p-phenylenediamine monohydrochloride สังเกตการเปลี่ยนสีของกระดาษกรอง

ผลการทดลอง

ปฏิกิริยาที่เป็นบวกจะเกิดสีม่วงเข้มตามรอยแตะของเชื้อบนกระดาษกรองภายใน 10 วินาที ปฏิกิริยาที่เป็นลบจะไม่มีการเปลี่ยนสีของกระดาษกรอง

Blazevic and Ederer (1975) อธิบายกลไกของการเปลี่ยนสีของอาหาร หรือเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นบนกระดาษจากการทดสอบแบบ Kovacs' Method ว่าใน Kovacs' reagentมีสาร Tetramethyl-p-phenylenediamine ซึ่งสารนี้ออกซิไดซ์ได้ง่าย โดยออกซิไดซ์ cytochrome C ทำให้เกิดสาร Wurster's blue ที่มีสีม่วง

10. ตรวจหาเอนไซม์คะตะเลส (Catalase Test)

เอนไซม์คะตะเลสเป็นเอนไซม์เร่งการแยกสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้เป็นน้ำกับออกซิเจน (Blazevic and Ederer, 1975) การตรวจหาเอนไซม์คะตะเลสใช้วิธี Slide Method

วิธีการ

1. หยดสารละลาย 3 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์บนแผ่นสไลด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ใช้ห่วงลวดแตะโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบ นำไปแตะบนหยดของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ผลการทดสอบ

ปฏิกิริยาที่เป็นบวกจะมีฟองก๊าซเกิดขึ้น ปฏิกิริยาที่เป็นลบจะไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

Blazevic and Ederer (1975) อธิบายการเกิดฟองก๊าซภายหลังจากหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนโคโลนีแบคทีเรีย หรือแตะเชื้อแบคทีเรียให้ผสมกับหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพราะว่าเอนไซม์คะตะเลสเป็นตัวเร่งให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สลายตัวได้เป็นน้ำ และก๊าซออกซิเจน ก๊าซออกซิเจนจะเกิดมากจนเห็นฟองก๊าซผุดขึ้นมา

11. การตรวจสอบความเป็นกรดใช้เมทิลเรด

เป็นการตรวจสอบการสร้างกรดจากน้ำตาลโดยขบวนการหมักซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถตรวจสอบได้โดยใช้ methyl red เป็น pH indicator การตรวจสอบความเป็นกรดโดยใช้เมทิลเรดใช้ Standard Method

วิธีการ

1. เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว MR-VP medium ที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 มม. นำหลอดทดสอบไปทำให้แบคทีเรียเจริญในตู้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 2-5 วัน

2. หยด methyl red solution ลงไปในหลอด 5 หยด สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดสอบ

ปฏิกิริยาที่เป็นบวกอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือส้ม ปฏิกิริยาที่เป็นลบอาหารจะไม่เปลี่ยนสี หรือเป็นสีเหลือง

Blazevic and Ederer (1975) อธิบายกลไกการเปลี่ยนอาหารเป็นสีแดงเพราะแบคทีเรียใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยผ่านขบวนการที่เรียกว่า Mixed acid fermentation ได้กรดอินทรีย์จำนวนมากเช่น กรดแลคติค กรดอซิติค ฯลฯ กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นเหล่านี้มีจำนวนมากพอที่จะทำให้อาหารมีสภาพเป็นกรด เมื่อหยดสารละลาย methyl red ซึ่งเป็น pH indicator เลยทำให้เกิดสีแดงหรือสีส้ม

12. ตรวจสอบสารอซีโตอีน (Voges Proskaver Test or VP-Test)

แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้าง butylene glycol และเอทานอลด้วยขบวนการ butylene glycol fermentation ของน้ำตาลกลูโคส ปฏิกิริยาการเกิดสาร butylene glycol และเอทานอลจะมีสาร acetyl methyl carbinol หรืออซีโตอีน (acetoin) เป็นสาร intermediate ปฏิกิริยาการหมักดังกล่าวนี้สามารถทดสอบได้โดยการตรวจหาอซีโตอีน (Blazevic and Ederer, 1975) วิธีการตรวจหาสารอซีโตอีนใช้ Barritt's Method

วิธีการ

1. เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว MR-VP medium ที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 มม. นำหลอดทดสอบไปทำให้แบคทีเรียเจริญในตู้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. หยด Barritt's reagent 5-6 หยดลงไป

ผลการทดสอบ

ปฏิกิริยาที่เป็นบวกจะเกิดสีแดงขึ้นในชั้นของอาหารภายใน 5 นาที ปฏิกิริยาที่เป็นลบอาหารจะไม่เปลี่ยนสี

Blazevic and Ederer (1975) อธิบายว่าปรากฏการณ์ที่เกิดสีแดงในอาหารหลังจากหยด Barritt's reagent เพราะใน Barritt's reagent มีสาร α-naphthol และ KOH สารอซีโตอีนถูกออกซิไดส์ โดย KOH ได้สาร diacetyl สาร diacetyl ทำปฏิกิริยากับกลุ่มอมิโน ($-NH_2$) ที่อยู่บน quanidine ในกรดอมิโนบางชนิดที่อยู่ใน peptone ได้เป็นสารประกอบสีแดง โดยมี α-naphthol เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยารวดเร็วขึ้น แต่ยังไม่ทราบกลไก

13. การตรวจหาเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส (Decarboxylase Test)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่มีขบวนการ Decarboxylation ของกรดอมิโน ซึ่งเป็นขบวนการที่ดึงเอาหมู่ carboxyl (-COOH) ออกจากกรดอมิโนในรูป CO_2 ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้ต้องอาศัยเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Blazevic and Ederer, 1975)

วิธีการ

เลี้ยงแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารคือ Falkow's Decarboxylase broth base ที่มี 2-arginine อาหารเตรียมไว้ในหลอดทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มม. ใช้ปิเปต 10 มล. ที่ปราศจากเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดูดพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อใส่ทับอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5-1 ซม. นำหลอดทดสอบไปทำให้แบคทีเรียเจริญในตู้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 4 วัน อ่านผลทุก ๆ วัน

ผลการทดสอบ

อาหารจะมีสีม่วงเข้มขึ้น หรือเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองในวันแรก ๆ และเปลี่ยนเป็นสีม่วงเหมือนเดิม หรือเป็นสีม่วงเข้มขึ้นในวันต่อ ๆ มา ถ้าแบคทีเรียที่ทดสอบมีเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส เนื่องจากในช่วงแรก ๆ แบคทีเรียสามารถทำให้เกิดการหมักจากน้ำตาล ทำให้เกิดกรดอาหารจึงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ปรากฏการณ์ที่อาหารเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มขึ้นในวันแรก ๆ หรือวันถัดมาเพราะการดึงเอาหมู่ -COOH ออกจากกรดอมิโนในรูปของ CO_2 นั้น ทำให้อาหารเปลี่ยนสภาพเป็นด่าง (Skerman, 1967. Branson, 1972. Edward and Ewing, 1972. Blazevic and Ederer, 1975. Collin and Lym, 1976)

Blazevic and Ederer (1975) อธิบายว่าเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลสมีปฏิกิริยาจำเพาะกับกรดอมิโน 6 ชนิดคือ Lysine, ornithine, arginine, tyrosine, histidine และ cadaverine ในขบวนการ Decarboxylation ของ lysine จะทำให้สารขั้นสุดท้ายคือ CO_2 และ cadaverine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่างมาก จึงทำให้ pH indicator ที่ใช้เปลี่ยนเป็นสีม่วงขึ้นในขณะที่เกิดขบวนการ carboxylation

14. Oxidation/Fermentation Test

เป็นวิธีการตรวจสอบการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนของแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการ

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบโดยวิธีการแทงลงตรง ๆ ในอาหารที่เป็น semisolid ที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบ (test tube) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 มม. เชื้อละ 2 หลอด ใช้ปิเปตขนาด 10 มล. ดูดพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อเติมลงบนอาหารที่เพาะเชื้อชุดที่ 1 หนา 0.5-1 ซม. ชุดที่ 2 ไม่ต้องเติมพาราฟิน นำหลอดทดสอบไปทำให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 4 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารทุกวัน

ผลการทดสอบ

อาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองในหลอดชุดที่ 1 แสดงว่าเกิดกรดจากการหมักของแบคทีเรีย แบคทีเรียบางชนิดนอกจากจะทำให้เกิดกรดแล้วทำให้เกิดก๊าซ CO_2 อีกด้วย

อาหารเปลี่ยนสีจากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองในหลอดชุดที่ 2 แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นสามารถสร้างกรดจากการออกซิไดส์อาหารพวกคาร์โบไฮเดรต

อาหารเปลี่ยนสีจากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองในหลอดทดสอบชุดที่ 1 และชุดที่ 2 แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นมีทั้งขบวนการหมักและการออกซิไดส์อาหารพวกคาร์โบไฮเดรตจนได้กรด

อาหารไม่เปลี่ยนสีในหลอดทดสอบทั้ง 2 ชุด แสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นไม่สามารถออกซิไดส์ และหมักจนเป็นกรดได้อาหารที่มี bromocresol purple เป็น pH indicator จึงไม่เปลี่ยนสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

15. Salt Susceptibility Test

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการทนความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ใน 0 %, 2 %, 4 % และ 6 % ใน salt broth

วิธีการ

เพาะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน เพาะเชื้อไว้ที่ 37 °ซ นาน 1 วัน

ผลการทดสอบ

ถ้าเชื้อแบคทีเรียสามารถทนในความเข้มข้นได้ก็จะทำให้ salt broth ขุ่นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

16. Antibiotic Test

เป็นการทดสอบความสามารถในการต้านทานของเชื้อแบคทีเรียโดยการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งบางพวกจะมีคุณสมบัติในการฆ่า (bactericidal) และบางอย่างมีผลในการยับยั้งการเติบโต(bacteriostatic)

วิธีการ

1. ใช้ไม้ที่มีสำลีพันปลาย จุ่มเชื้อแบคทีเรียจากอาหารเหลว (trypticase soya broth) กดสำลีข้างขวดแล้วปิดเพื่อไม่ให้น้ำโชกจนเกินไป

2. นำไปกวาดบนผิว antibiotic assay agar จนทั่ว

3. ใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วคีบเอากระดาษที่มีสารปฏิชีวนะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. วางแผ่นกระดาษกรองลงบนผิววุ้นในจานให้ห่างกันพอสมควร (ไม่ควรเกิน 4 แผ่น)

5. ทิ้งไว้สักครู่จึงกลับจาน แล้วเพาะในตู้เพาะเชื้อ 37 °ซ นาน 1 วัน

ผลการทดสอบ

จะเกิด clear zone หรือไม่ก็ได้แล้วแต่เชื้อแบคทีเรียจะมีความไวต่อยามากน้อยแค่ไหน โดยการวัดขนาดของ clear zone (มม.) เทียบกับตารางมาตรฐานในตารางภาคผนวก จ. แล้วอ่านผลตามตาราง

17. A.H. Test

อาหารชนิดนี้จะใช้ทดสอบหลายอย่างด้วยกันโดยจะดูความสามารถในการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์, การเกิดกรดเนื่องจากการใช้น้ำตาล, การเกิดด่างที่ผิวหน้าของอาหาร และดูการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย (Kaper และคณะ, 1979)

วิธีการ

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหาร A.H.medium ที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 มม. นำหลอดทดสอบไปทำให้แบคทีเรียเจริญในตู้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 วัน

ผลการทดสอบ

ถ้าเชื้อ Positive

Top ที่ผิวหน้าจะเป็นสีม่วง (alkaline)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Bott ที่ก้นหลอดจะมีสีเหลือง (acid)

Motility จะเคลื่อนที่ออกทุกทิศทาง

H_2S จะเกิดสีดำขึ้นในหลอด

ถ้าเชื้อ Negative สีของอาหารจะไม่เปลี่ยนแปลงเป็นสีม่วงเหมือนเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง.

วิธีเตรียมสารเคมี (Reagents) ที่ใช้ในการวัดปริมาณออกซิเจนที่อยู่ในน้ำ

1. Manganous sulfate solution

ใช้ $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 480 กรัม หรือ $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 400 กรัม หรือ $MnSO_4 \cdot H_2O$ 364 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ให้มีปริมาตร 1 ลิตร

2. Alkaline-iodine solution

ใช้ NaOH 500 กรัม หรือ KOH 700 กรัม และ NaI 135 กรัม หรือ KI 150 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร

3. กรดกำมะถันเข้มข้น

ใช้ H_2SO_4 เข้มข้นที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.83-1.84

4. Sodium thiosulfate solution

ใช้ $Na_2S_2O_3$ 6.20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มใหม่ ๆ ให้มีปริมาตร 1 ลิตร (นี่คือ $\frac{N}{40}$ $Na_2S_2O_3$) สามารถทำให้คุณภาพคงที่อยู่ได้นาน โดยเติม 5 มล. ของ Chloroform ทุก ๆ 2-3 สัปดาห์

5. น้ำแป้ง

ใช้แป้งมัน 5 กรัม ผสมน้ำกลั่นเล็กน้อย เทลงใน 1 ลิตร ของน้ำกลั่นต้ม คนให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้หลาย ๆ ชั่วโมง ดูดเอาส่วนของเหลวข้างบนเติมด้วย 1.25 กรัม ของกรด salicylic ต่อลิตร เพื่อเก็บไว้นาน ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. Potassium permanganate solution

ใช้ Potassium permanganate ($KMnO_4$) 6.32 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร

7. Postassium oxalate solution (COOK, H_2O)

ใช้ COOK, H_2O 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. (สารละลายนี้เสื่อมคุณภาพเร็วให้เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทดลอง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Zone diameter interpretive standards and approximate MIC correlates (Lennette, 1976)

Antibiotic	Disc content	Zone diameter (nearest whole mm.)			Approximate MIC correlate	
		Resistant	Intermediate	Susceptible	Resistant	Susceptible
Ampicillin when testing Gram negative enteric Organisms and Enterococci	10 µg	≤11	12-13	≥14	≥3 µg/ml	≤8 µg/ml
Staphylococci and penicillin G.	10 µg	≤20	21-18	≥29	≥2 µg/ml Penicillinase+	≤0.2 µg/ml
Susceptible microorganisms						
Haemophilus species	10 µg	≤19	-	≥20	-	≤2.0 µg/ml
Darbenicellin when testing Proteus species and Escherichia coli	50 µg	≤17	18-22	≥23	≥32 µg/ml	≤16 µg/ml
Pseudomonas aeruginosa	50 µg	≤12	13-14	≥15	≥250 µg/ml	≤125 µg/ml
Cephalothin	30 µg	≤14	15-17	≥18	≥32 µg/ml	≤10 µg/ml
Chloramphenicol	30 µg	≤12	13-17	≥18	≥25 µg/ml	≤12.5 µg/ml
Clindamycin	2 µg	≤14	15-16	≥17	≥2 µg/ml	≤1 µg/ml
Erythromycin	15 µg	≤13	14-17	≥18	≥8 µg/ml	≤2 µg/ml
Gentamicin	10 µg	≤12	-	≥13	≥6 µg/ml	≤6 µg/ml
Bacitracin	10 units	≤8	9-12	≥13	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Copyright© by Chulalongkorn University
All rights reserved

Antibiotic	Disc content	Zone diameter (nearest whole mm.)			Approximate MIC correlate	
		Resistant	Intermediate	Susceptible	Resistant	Susceptible
Kanamycin	30 µg	≤13	14-17	≥18	≥25 µg/ml	≤6 µg/ml
Methicillin	5 µg	≤ 9	10-13	≥14	-	≤3 µg/ml
Penicillin G. When testing Staphylococci	10 units	≤20	21-28	≥29	penicillinase+	≤0.1 µg/ml
Other microorganisms	10 units	≤11	12-21	≥22	≥32 µg/ml	≤1.5 µg/ml
Polymyxin B++	300units	≤ 8	9-11	≥12	≥50 µg/ml	-
Streptomycin	10 µg	≤11	12-14	≥15	≥15 µg/ml	≤6 µg/ml
Tetracycline	30 µg	≤14	15-18	≥19	≥12 µg/ml	≤4 µg/ml
Vancomycin	30 µg	≤ 9	10-11	≥12	-	≤5 µg/ml
Nalidixic acid+++	30 µg	≤13	14-18	≥19	≥32 µg/ml	≤12 µg/ml
Lincomycin	2 µg	≤ 9	10-14	≥15	-	-
Novobiocin	30 µg	≤17	18-21	≥22	-	-
Colistin	10 µg	≤ 8	9-10	≥11	≥ 4 µg/ml	-

\+ Resistant S. aureus strains are penicillinase producers.

++ Polymyxin B diffuses poorly in agar and the accuracy of the diffusion method is thus less than with other antibiotics.

+++ Use for urinary tract-infecting organisms only.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติการศึกษา

ชื่อ นายทรงศักดิ์ บูรณเศวตธรรม

เกิดวันที่ 8 มกราคม พ.ศ.2503

ประวัติการศึกษา สำเร็จมัธยมศึกษาตอนต้น พ.ศ.2518
จากโรงเรียนกรุณาศึกษา จังหวัดขอนแก่น

สำเร็จมัธยมศึกษาตอนปลาย พ.ศ.2520
จากโรงเรียนขอนแก่นวิทยายน จังหวัดขอนแก่น

สำเร็จการศึกษาชั้นประกาศนียบัตรวิชาการศึกษาชั้นสูง พ.ศ.2522
จากวิทยาลัยครูมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

สำเร็จการศึกษาชั้นการศึกษาบัณฑิต พ.ศ.2524
จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

ประสบการณ์ทางด้านวิชาการ เป็นอาจารย์สอนชีววิทยาในระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย
โรงเรียนหนองสองวิทยา อำเภอหนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved